

10/521622  
Re PCT/PTO 14 FEB 2005  
PCT/JP 03/08937

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

14.07.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日                      2 0 0 2 年    7 月 1 6 日  
Date of Application:

出 願 番 号                      特 願 2 0 0 2 - 2 0 7 6 1 1  
Application Number:  
[ST. 10/C] :                      [ J P 2 0 0 2 - 2 0 7 6 1 1 ]

出 願                      人                      独立行政法人農業生物資源研究所  
Applicant(s):

REC'D 29 AUG 2003

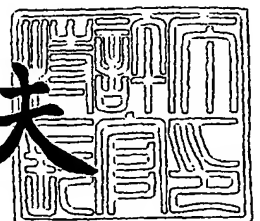
WIPO                      PCT

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 3 年    8 月 1 4 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願

【整理番号】 J102412154

【提出日】 平成14年 7月16日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 A01H 1/00  
C12N 5/10

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台 2 - 1 - 2 独立行政法人農業生物資源研究所内

【氏名】 萩尾 高志

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台 2 - 1 - 2 独立行政法人農業生物資源研究所内

【氏名】 田部井 豊

【特許出願人】

【識別番号】 501167644

【氏名又は名称】 独立行政法人農業生物資源研究所

【代理人】

【識別番号】 100078282

【弁理士】

【氏名又は名称】 山本 秀策

【選任した代理人】

【識別番号】 100062409

【弁理士】

【氏名又は名称】 安村 高明

【選任した代理人】

【識別番号】 100113413

【弁理士】

【氏名又は名称】 森下 夏樹

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 減圧処理または加圧処理と、エレクトロポレーションによる植物の形質転換方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 形質転換植物を作製する方法であって、以下の工程：

- a) 植物組織を大気圧と異なる圧力下に維持する工程；および
- b) エレクトロポレーションを用いて、所望の遺伝子を植物へ導入する工程、を包含する方法。

【請求項 2】 前記組織を大気圧と異なる圧力下に維持する工程が、前記組織を減圧処理する工程である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】 前記組織を大気圧と異なる圧力下に維持する工程が、前記組織を加圧処理する工程である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】 前記組織を大気圧と異なる圧力下に維持する工程が、所望の遺伝子を植物へ導入する工程の前に行われる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】 前記減圧処理する工程が、大気圧よりも 0.096 MPa 低い減圧下で行われる、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 6】 前記植物組織が、植物の休眠組織である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】 前記植物の休眠組織が種子である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】 前記種子が、単子葉植物の種子である請求項 7 に記載の方法

。

【請求項 9】 前記単子葉植物の種子がイネ科の種子である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】 前記イネ科種子がコムギ種子である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】 前記イネ科種子がイネ種子である、請求項 9 に記載の方法

。

【請求項 12】 前記イネ科種子がトウモロコシ種子である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 13】 前記種子が、双子葉植物の種子である請求項 7 に記載の方法。

【請求項 14】 前記双子葉植物の種子がアブラナ科種子である、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】 前記アブラナ科種子がハクサイ種子である、請求項 14 の方法。

【請求項 16】 前記アブラナ科種子がナタネ種子である、請求項 14 の方法。

【請求項 17】 前記双子葉植物の種子がマメ科種子である、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 18】 前記マメ科種子がダイズ種子である、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】 前記双子葉植物の種子がナス科種子である、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 20】 前記ナス科種子がトマト種子である、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】 前記双子葉植物の種子がウリ科種子である、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 22】 前記ウリ科種子がマクワウリ種子である、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】 前記双子葉植物の種子がヒルガオ科種子である、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 24】 前記ヒルガオ科種子がアサガオである、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】 形質転換植物を作製する方法であって、以下の工程：  
a) 請求項 7 に記載の方法によって、形質転換された種子を作製する工程；および  
b) 該種子を成長させる工程、  
を包含する方法。

【請求項 26】 前記種子が、単子葉植物の種子である請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】 前記単子葉植物の種子がイネ科の種子である、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】 前記イネ科種子がコムギ種子である、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】 前記イネ科種子がイネ種子である、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 30】 前記イネ科種子がトウモロコシ種子である、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 31】 前記種子が、双子葉植物の種子である請求項 25 に記載の方法。

【請求項 32】 前記双子葉植物の種子がアブラナ科種子である、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】 前記アブラナ科種子がハクサイ種子である、請求項 32 の方法。

【請求項 34】 前記アブラナ科種子がナタネ種子である、請求項 32 の方法。

【請求項 35】 前記双子葉植物の種子がマメ科種子である、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 36】 前記マメ科種子がダイズ種子である、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】 前記双子葉植物の種子がナス科種子である、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 38】 前記ナス科種子がトマト種子である、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】 前記双子葉植物の種子がウリ科種子である、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 40】 前記ウリ科種子がマクワウリ種子である、請求項 39 に記

載の方法。

【請求項 4 1】 前記双子葉植物の種子がヒルガオ科種子である、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 4 2】 前記ヒルガオ科種子がアサガオである、請求項 4 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、減圧処理または加圧処理と、エレクトロポレーションを用いて、所望の遺伝子を植物組織へ導入し、形質転換体を作成する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

コムギ、オオムギ、イネ、トウモロコシ、ダイズなどの主要穀物は人類の生存にとって必須のものであるが、世界的な人口増加に見合った食料を確保していくためには、現在より収量の多い作物を開発していく必要がある。収率を上げる品種改良の一つとして、組換え DNA を用いた形質転換作物の開発が行われている。

【0003】

また、例えば、ハクサイ、トマト、キュウリなどの野菜類は食生活を豊かにし、栄養面でも必須の作物である。しかしながら、これらの野菜は様々な病虫害に弱く、遺伝子組換え技術の利用により耐病虫害性を付与することができるならば、収穫量を安定させることが可能となる。そのため、有用な遺伝子の単離と共にこれらの遺伝子を用いる形質転換方法が開発されてきた。

【0004】

形質転換を行うためには、一般に、植物に対して直接的に遺伝子導入を行う方法（直接的遺伝子導入法）、または植物に対して間接的に遺伝子導入を行う方法（間接的遺伝子導入法）が行われる。

【0005】

現在までに、間接的な遺伝子導入法として、アグロバクテリウムを利用した方

法が広く利用されている。例えばイネの完熟種子を培養して3週間後に得られたカルスに対してアグロバクテリウムを感染させる方法 (Hieiら、Plant Journal、6:271-282, 1994を参照) あるいは、発芽後4-5日の種子に対してアグロバクテリウムを感染させて形質転換体を迅速に得ることができる方法 (田中ら、特許第3141084号を参照) を挙げることができる。

#### 【0006】

一方、直接的遺伝子導入方法として、パーティクルガン法 (Christou, P. ら、Bio/Technology、9:957-962, 1991を参照)、ポリエチレングリコール法 (Datta, S. K. ら、Bio/Technology、8:736-740, 1990を参照)、およびエレクトロポレーション法 (Shimamoto, K. らNature、338:274-276, 1989を参照) などが形質転換体の作出に利用されている。エレクトロポレーション法は、所望のDNAを含む溶液に植物細胞を入れ、電氣的刺激により遺伝子を細胞内に取り込むことによって、遺伝子導入を行うものである。

#### 【0007】

これらの直接的遺伝子導入方法は、間接的遺伝子導入方法と比較して、アグロバクテリウムの培養・調製が不要であるなどの利点を有する。しかし、直接的遺伝子導入方法であるパーティクルガン法の場合には、形質転換組織から形質転換植物を再生する効率が依然として低いという欠点がある (Hagio、1998、JARQ 32 (4) 239-247)。エレクトロポレーション法の場合には、適用可能な組織が限定されるという欠点がある。そのため、直接的遺伝子導入方法の適用は制限されていた。

#### 【0008】

従来のエレクトロポレーション法は、細胞壁を取り去った細胞 (例えば、プロトプラスト) に対してのみ可能であった。これに対して、細胞壁を有する植物 (例えば、種子などの休眠組織) に対しては、エレクトロポレーションを行うことが、不可能であると考えられていた。実際に、種子をエレクトロポレーションによって形質転換する方法は報告されていない。従って、従来のエレクトロ



ポレーション法を用いて形質転換植物を得るためには、プロトプラストなどの組織に対して遺伝子導入をした後に、プロトプラスト培養や再分化などの組織培養の操作が必須であり、そのため、必ずしも簡便な方法ではなく、費用、時間および労力を必要とした。

#### 【0009】

一方、コムギへ遺伝子導入する場合には、未熟胚が用いられていた(J. T. Weeksら、Plant. Physiol. 102:1077-1084, 1993を参照)。しかし、未熟胚を入手するためには、圃場や温室で植物を育成しなければならず、圃場では6-7ヶ月、温室では3-5ヶ月を要する。

#### 【0010】

したがって、アグロバクテリウムなどの培養・調製を必要とせず、遺伝子導入する試料の調製が容易であり、かつ、遺伝子導入の後の形質転換体を容易に得ることができる、簡便かつ迅速な形質転換法は存在していない。

#### 【0011】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明の解決しようとする課題は、簡便かつ迅速な植物形質転換方法が確立されていないという上記現状に鑑み、当該分野において、(1) アグロバクテリウムなどの培養・調製を必要とせず、(2) 遺伝子導入する試料の調製が容易であり、かつ、(3) 遺伝子導入の後の形質転換体を容易に得ることができる、簡便かつ迅速な植物形質転換方法を提供することである。

#### 【0012】

簡便かつ迅速な本発明の方法を用いることによって、形質転換植物体を、迅速かつ大量に得ることが可能になる。従って、本発明は、植物形質転換体を得ることが必要な産業分野のみならず、植物を用いる開発研究においても大量処理・大量解析を容易にせしめ、ひいては飛躍的な研究の進歩を誘発し、画期的な組換え作物の開発につながる。

#### 【0013】

##### 【課題を解決するための手段】

上記課題は、

- 1) 植物組織を大気圧と異なる圧力下に維持する工程; および
  - 2) エレクトロポレーションを用いて、所望の遺伝子を植物へ導入する工程、
- を包含する形質転換植物を作製する方法によって達成された。

**【0014】**

具体的には、本願明細書において発明者らは、植物に対してエレクトロポレーションを行うために、遺伝子を取り込まれやすいように細胞を処理する方法として各種試みた。その結果、(1) 植物を真空状態に保ち、*Agrobacterium*を用いる形質転換法は、*Arabidopsis*以外の植物には効果的でないこと、および(2) *Agrobacterium*を用いる形質転換のためには、植物を真空状態に保つ必要がないこと (*Bent, Plant Physiology*, 2000年12月、vol. 124、pp. 1540-15447)、という従来知見に反して、実施例に示すように、エレクトロポレーションを用いる植物形質転換において、植物組織を大気圧と異なる圧力下に維持する工程を用いることが最適であることを見出した。

**【0015】**

本方法は極めて簡便である。さらに、本発明は、遺伝子導入操作後に通常必要な培養過程を含まないため、培養変異について考慮する必要はないという利点も有する。

**【0016】**

本発明はまた、従来法では遺伝子導入が不可能であるか、または極めて困難であった植物種に対する形質転換を可能にするという利点を提供する。具体的には、実施例において用いたコムギ品種農林61号は、日本におけるコムギ主要品種の1つであるが、組織培養における植物体の再生が不可能であるため、従来法での形質転換が非常に困難であった (*Machiiら*, 1998, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 53:67-74)。しかし、本明細書の実施例に記載するように、従来法では遺伝子導入が不可能であるか、または極めて困難であった植物種について、本発明を用いて形質転換を容易に行うことが可能となった。

**【0017】**

従って、本発明は以下を提供する。

【0018】

1. 形質転換植物を作製する方法であって、以下の工程：
  - a) 植物組織を大気圧と異なる圧力下に維持する工程；および
  - b) エレクトロポレーションを用いて、所望の遺伝子を植物へ導入する工程、を包含する方法。

【0019】

2. 前記組織を大気圧と異なる圧力下に維持する工程が、前記組織を減圧処理する工程である、項目1に記載の方法。

【0020】

3. 前記組織を大気圧と異なる圧力下に維持する工程が、前記組織を加圧処理する工程である、項目1に記載の方法。

【0021】

4. 前記組織を大気圧と異なる圧力下に維持する工程が、所望の遺伝子を植物へ導入する工程の前に行われる、項目1に記載の方法。

【0022】

5. 前記減圧処理する工程が、大気圧よりも0.096MPa低い減圧下で行われる、項目2に記載の方法。

【0023】

6. 前記植物組織が、植物の休眠組織である、項目1に記載の方法。

【0024】

7. 前記植物の休眠組織が種子である、項目1に記載の方法。

【0025】

8. 前記種子が、単子葉植物の種子である項目7に記載の方法。

【0026】

9. 前記単子葉植物の種子がイネ科の種子である、項目8に記載の方法。

【0027】

10. 前記イネ科種子がコムギ種子である、項目9に記載の方法。

【0028】

11. 前記イネ科種子がイネ種子である、項目9に記載の方法。

【0029】

12. 前記イネ科種子がトウモロコシ種子である、項目9に記載の方法。

【0030】

13. 前記種子が、双子葉植物の種子である項目7に記載の方法。

【0031】

14. 前記双子葉植物の種子がアブラナ科種子である、項目13に記載の方法。

【0032】

15. 前記アブラナ科種子がハクサイ種子である、項目14の方法。

【0033】

16. 前記アブラナ科種子がナタネ種子である、項目14の方法。

【0034】

17. 前記双子葉植物の種子がマメ科種子である、項目13に記載の方法。

【0035】

18. 前記マメ科種子がダイズ種子である、項目17に記載の方法。

【0036】

19. 前記双子葉植物の種子がナス科種子である、項目13に記載の方法。

【0037】

20. 前記ナス科種子がトマト種子である、項目19に記載の方法。

【0038】

21. 前記双子葉植物の種子がウリ科種子である、項目13に記載の方法。

【0039】

22. 前記ウリ科種子がマクワウリ種子である、項目21に記載の方法。

【0040】

23. 前記双子葉植物の種子がヒルガオ科種子である、項目13に記載の方法。

【0041】

24. 前記ヒルガオ科種子がアサガオである、項目23に記載の方法。

## 【0042】

25. 形質転換植物を作製する方法であって、以下の工程:

- a) 項目7に記載の方法によって、形質転換された種子を作製する工程; および
  - b) 該種子を成長させる工程、
- を包含する方法。

## 【0043】

26. 前記種子が、単子葉植物の種子である項目25に記載の方法。

## 【0044】

27. 前記単子葉植物の種子がイネ科の種子である、項目26に記載の方法

。

## 【0045】

28. 前記イネ科種子がコムギ種子である、項目27に記載の方法。

## 【0046】

29. 前記イネ科種子がイネ種子である、項目27に記載の方法。

## 【0047】

30. 前記イネ科種子がトウモロコシ種子である、項目27に記載の方法。

## 【0048】

31. 前記種子が、双子葉植物の種子である項目25に記載の方法。

## 【0049】

32. 前記双子葉植物の種子がアブラナ科種子である、項目31に記載の方法。

## 【0050】

33. 前記アブラナ科種子がハクサイ種子である、項目32の方法。

## 【0051】

34. 前記アブラナ科種子がナタネ種子である、項目32の方法。

## 【0052】

35. 前記双子葉植物の種子がマメ科種子である、項目31に記載の方法。

## 【0053】

36. 前記マメ科種子がダイズ種子である、項目35に記載の方法。

## 【0054】

37. 前記双子葉植物の種子がナス科種子である、項目31に記載の方法。

## 【0055】

38. 前記ナス科種子がトマト種子である、項目37に記載の方法。

## 【0056】

39. 前記双子葉植物の種子がウリ科種子である、項目31に記載の方法。

## 【0057】

40. 前記ウリ科種子がマクワウリ種子である、項目39に記載の方法。

## 【0058】

41. 前記双子葉植物の種子がヒルガオ科種子である、項目31に記載の方法。

## 【0059】

42. 前記ヒルガオ科種子がアサガオである、項目41に記載の方法。

## 【0060】

## 【発明の実施の形態】

以下、本発明を説明する。本明細書の全体にわたり、単数形の表現は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。また、本明細書において使用される用語は、特に言及しない限り、当該分野で通常用いられる意味で用いられることが理解されるべきである。

## 【0061】

以下に本明細書において特に使用される用語の定義を列挙する。

## 【0062】

本明細書において、用語「形質転換」と「遺伝子導入」は互換可能に使用される。「形質転換」とは、植物細胞または植物組織に、遺伝子を含む核酸を導入することによって、植物細胞または植物組織の表現型に変化を生じることを意味する。

## 【0063】

用語「形質転換体」とは、形質転換によって作製された細胞などの生命体の全部または一部をいう。形質転換体としては、原核細胞、および植物細胞等が例示

される。形質転換体は、その対象に依存して、形質転換細胞、形質転換組織、形質転換宿主などともいわれ、本明細書においてそれらの形態をすべて包含するが、特定の文脈において特定の形態を指し得る。

#### 【0064】

本発明において形質転換のために使用される「植物組織」としては、休眠組織、生殖質、生長点、および花芽が挙げられるが、これに限定されない。好ましい休眠組織としては、完熟種子、未熟種子、冬芽、および塊茎が挙げられ、特に好ましくは完熟種子であるが、これに限定されない。

#### 【0065】

本願明細書において使用する場合、用語「選抜」とは、形質転換植物を薬物存在下で培養および／または育成することによって、薬物耐性遺伝子によって形質転換された形質転換体を、形質転換されていない植物とを区別する工程を意味する。

#### 【0066】

本明細書において使用する場合、用語「エレクトロポレーション」とは、直流の高電圧パルスを用いて物理的に植物細胞に小孔をあけ、そこから遺伝子を細胞内に導入する方法をいう。エレクトロポレーションの条件は、使用する植物種、植物組織に依存して、当業者が適宜選択し得る。代表的なエレクトロポレーションの電圧の条件は、 $10\text{ V/cm} \sim 200\text{ V/cm}$ 、好ましくは $20\text{ V/cm} \sim 150\text{ V/cm}$ 、より好ましくは $30\text{ V/cm} \sim 120\text{ V/cm}$ 、なおより好ましくは $40\text{ V/cm} \sim 100\text{ V/cm}$ 、最も好ましくは $50\text{ V/cm} \sim 100\text{ V/cm}$ であるが、これらに限定されない。代表的なエレクトロポレーションのパルス幅の条件は、 $10\text{ マイクロ秒} \sim 90\text{ マイクロ秒}$ 、好ましくは $20\text{ マイクロ秒} \sim 80\text{ マイクロ秒}$ 、より好ましくは $30\text{ マイクロ秒} \sim 80\text{ マイクロ秒}$ 、さらにより好ましくは $40\text{ マイクロ秒} \sim 70\text{ マイクロ秒}$ 、最も好ましくは $50\text{ マイクロ秒} \sim 60\text{ マイクロ秒}$ であるが、これらに限定されない。代表的なエレクトロポレーションのパルスの回数は、 $1\text{ 回} \sim 200\text{ 回}$ 、好ましくは $10\text{ 回} \sim 150\text{ 回}$ 、より好ましくは $20\text{ 回} \sim 120\text{ 回}$ 、なおより好ましくは $30\text{ 回} \sim 110\text{ 回}$ 、最も好ましくは $40\text{ 回} \sim 100\text{ 回}$ であるが、これらに限定されない。

## 【0067】

本発明においてエレクトロポレーションを行う際に使用されるエレクトロポレーションチャンバーは、形質転換の対象となる植物組織を収容できるものであれば、どのような大きさであってもよい。例示的なエレクトロポレーションチャンバーは、白金電極を備える縦1 cm×横2 cm×高さ2 cmのエレクトロポレーションチャンバーである。このエレクトロポレーションチャンバー内において、白金電極間の距離は、1 cmである。

## 【0068】

本願明細書において使用する場合、「植物組織を大気圧と異なる圧力下に維持する」とは、植物組織を、大気圧（通常は、1気圧=101.325 kPa=約0.1 MPa）よりも高い圧力下に維持する工程（加圧処理）、または低い圧力下に維持する工程（減圧処理）をいう。

## 【0069】

理論に拘束されることを意図しないが、植物組織を大気圧と異なる圧力下に維持することによって、植物組織が受ける環境中の圧力が変化し、DNAを含む緩衝液が組織間・細胞間に浸透しやすくなり、その結果、従来不可能であった細胞壁を有する植物組織を標的とするエレクトロポレーションによる形質転換が可能になったものと考えられる。

## 【0070】

本明細書において使用する場合、用語「減圧処理」とは、形質転換される種子を大気圧より低い気圧下に維持する処理をいう。本発明において、減圧処理は、大気圧よりも、0.02 MPa低い圧力、好ましくは0.04 MPa低い圧力、より好ましくは0.06 MPa低い圧力、さらにより好ましくは0.08 MPa低い圧力、最も好ましくは0.096 MPa低い圧力で行われるが、これらに限定されない。減圧処理の時間は、1分～120分、好ましくは10分～100分、より好ましくは15分～90分、さらにより好ましくは30分～70分、最も好ましくは約60分であるが、これらに限定されない。

## 【0071】

本明細書において使用する場合、用語「加圧処理」とは、形質転換される種子



を大気圧より高い気圧下に維持する処理をいう。

#### 【0072】

好ましくは、減圧処理または加圧処理をする種子を、処理前に、水（例えば、水道水）中に放置する。処理前の種子を水中に放置する場合、その放置時間は、6時間～48時間、好ましくは12時間～36時間、より好ましくは18時間～30時間、さらにより好ましくは20時間～26時間、最も好ましくは約24時間であるが、これらに限定されない。

#### 【0073】

本発明における例示的な形質転換の条件は、種子を25℃で一晩水道水中に放置し、翌日、真空装置の中に置き、大気圧より0.096 MPa低い圧力にて1時間減圧処理を行い、その後、減圧処理した種子に対して、エレクトロポレーションによる高電圧パルス（100V、50マイクロ秒、ただし、電極間の距離は1cm）を50回程度かけ、遺伝子導入を行うという条件である。電圧およびパルス回数は作物によって変化し得る。その後、抗生物質を含む培地において選抜し、その後鉢上げ（ポットでの育成）により通常の植物個体を得ることができる。

#### 【0074】

本明細書において用いられる「植物」とは、植物界に属する生物の総称であり、クロロフィル、かたい細胞壁、豊富な永続性の胚的組織の存在、および運動する能力がない生物により特徴付けられる。代表的には、植物は、細胞壁の形成・クロロフィルによる同化作用をもつ顕花植物をいう。「植物」は、単子葉植物および双子葉植物のいずれも含む。単子葉植物としては、イネ科植物が挙げられる。好ましい単子葉植物としては、トウモロコシ、コムギ、イネ、エンバク、オオムギ、ソルガム、ライムギ及びアワが挙げられ、さらに好ましくは、トウモロコシ、コムギ、イネが挙げられるが、これらに限定されない。双子葉植物としては、アブラナ科植物、マメ科植物、ナス科植物、ウリ科植物、ヒルガオ科植物が挙げられるが、これらに限定されない。アブラナ科植物としては、ハクサイ、ナタネ、キャベツ、カリフラワーが挙げられるが、これらに限定されない。好ましいアブラナ科植物は、ハクサイおよびナタネである。特に好ましいアブラナ科植物

は、ナタネである。マメ科植物としては、ダイズ、アヅキ、インゲンマメ、ササゲが挙げられるが、これらに限定されない。好ましいマメ科植物は、ダイズである。ナス科植物としては、トマト、ナス、バレイショが挙げられるが、これらに限定されない。好ましいナス科植物は、トマトである。ウリ科植物としては、マクワウリ、キュウリ、メロン、スイカが挙げられるが、これらに限定されない。好ましいウリ科植物は、マクワウリである。ヒルガオ科植物としては、アサガオ、カンショ、ヒルガオが挙げられるが、これらに限定されない。好ましいヒルガオ科植物は、アサガオである。特に他で示さない限り、植物は、植物体、植物器官、植物組織、植物細胞、および種子のいずれをも意味する。植物器官の例としては、根、葉、茎、および花などが挙げられる。植物細胞の例としては、カルスおよび懸濁培養細胞が挙げられる。特定の実施形態では、植物は、植物体を意味し得る。別の実施形態において、本発明において使用され得る植物種の例としては、ナス科、イネ科、アブラナ科、バラ科、マメ科、ウリ科、シソ科、ユリ科、アカザ科、セリ科、ヒルガオ科、キク科などの植物が挙げられる。

#### 【0075】

アブラナ科の植物の例としては、*Raphanus*、*Brassica*、*Arabidopsis*、*Wasabia*、または*Capsella*に属する植物が挙げられ、例えば、大根、アブラナ、シロイヌナズナ、ワサビ、ナズナなどを含む。

#### 【0076】

イネ科の植物の例としては、*Oryza*、*Triticum*、*Hordeum*、*Secale*、*Saccharum*、*Sorghum*、または*Zea*に属する植物が挙げられ、例えば、イネ、オオムギ、ライムギ、サトウキビ、ソルガム、トウモロコシなどを含む。

#### 【0077】

本明細書において、「トランスジェニック植物」とは、特定の遺伝子が組み込まれた植物をいう。

#### 【0078】

本明細書では、植物の栽培は当該分野において公知の任意の方法により行うこ

とができる。植物の栽培方法は、例えば、モデル植物の実験プロトコル「イネ・シロイヌナズナ編」：細胞工学別冊植物細胞工学シリーズ4；イネの栽培法（奥野員敏）pp. 28-32、およびアラビドプシスの栽培法（丹羽康夫）pp. 33-40（監修 島本功、岡田清孝）に例示されており、当業者であれば容易に実施することができることから本明細書では詳述する必要はない。例えば、シロイヌナズナの栽培は土耕、ロックウール耕、水耕いずれでも行うことができる。白色蛍光灯（6000ルクス程度）の下、恒明条件で栽培すれば播種後4週間程度で最初の花が咲き、開花後16日程度で種子が完熟する。1さやで40～50粒の種子が得られ、播種後2～3ヶ月で枯死するまでの間に10000粒程度の種子が得られる。

#### 【0079】

本明細書において使用される場合、導入される遺伝子は、ポリヌクレオチドからなる。

#### 【0080】

本明細書において使用される用語「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」および「核酸」は、本明細書において同じ意味で使用され、任意の長さのヌクレオチドのポリマーをいう。この用語はまた、「誘導体オリゴヌクレオチド」または「誘導体ポリヌクレオチド」を含む。「誘導体オリゴヌクレオチド」または「誘導体ポリヌクレオチド」とは、ヌクレオチドの誘導体を含むか、またはヌクレオチド間の結合が通常とは異なるオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドをいい、互換的に使用される。そのようなオリゴヌクレオチドとして具体的には、例えば、2'-O-メチル-リボヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスホロチオエート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN3'-P5' ホスホロアミデート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合とがペプチド核酸結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5 プロピニルウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5 チアゾールウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌ

クレオチド中のシトシンがC-5プロピニルシトシンで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン (phenoxazine-modified cytosine) で置換された誘導体オリゴヌクレオチド、DNA中のリボースが2'-O-プロピルリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド中のリボースが2'-メトキシエトキシリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチドなどが例示される。他にそうではないと示されなければ、特定の核酸配列はまた、明示的に示された配列と同様に、その保存的に改変された改変体（例えば、縮重コドン置換体）および相補配列を包含することが企図される。具体的には、縮重コドン置換体は、1またはそれ以上の選択された（または、すべての）コドンの3番目の位置が混合塩基および/またはデオキシイノシン残基で置換された配列を作成することにより達成され得る (Batzeraら、Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsukaら、J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); Rossoliniら、Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994))。用語「核酸」はまた、本明細書において、遺伝子、cDNA、mRNA、オリゴヌクレオチド、およびポリヌクレオチドと互換可能に使用される。特定の核酸配列はまた、「スプライス改変体」を包含する。同様に、核酸によりコードされた特定のタンパク質は、その核酸のスプライス改変体によりコードされる任意のタンパク質を暗黙に包含する。その名が示唆するように「スプライス改変体」は、遺伝子のオルタナティブスプライシングの産物である。転写後、最初の核酸転写物は、異なる（別の）核酸スプライス産物が異なるポリペプチドをコードするようにスプライスされ得る。スプライス改変体の産生機構は変化するが、エキソンのオルタナティブスプライシングを含む。読み越し転写により同じ核酸に由来する別のポリペプチドもまた、この定義に包含される。スプライシング反応の任意の産物（組換え形態のスプライス産物を含む）がこの定義に含まれる。

#### 【0081】

本明細書において「遺伝子」とは、遺伝形質を規定する因子をいう。通常染色体上に一定の順序に配列している。タンパク質の一次構造を規定する遺伝子を構

造遺伝子といい、その発現を左右するものを調節遺伝子という。本明細書では、「遺伝子」は、「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」および「核酸」をさすことがある。本明細書において遺伝子の「相同性」とは、2以上の遺伝子配列の、互いに対する同一性の程度をいう。従って、ある2つの遺伝子の相同性が高いほど、それらの配列の同一性または類似性は高い。2種類の遺伝子が相同性を有するか否かは、配列の直接の比較、または核酸の場合ストリンジェントな条件下でのハイブリダイゼーション法によって調べられ得る。2つの遺伝子配列を直接比較する場合、その遺伝子配列間でDNA配列が、代表的には少なくとも50%同一である場合、好ましくは少なくとも70%同一である場合、より好ましくは少なくとも80%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一である場合、それらの遺伝子は相同性を有する。

#### 【0082】

本明細書では塩基配列の同一性の比較および相同性の算出は、配列分析用ツールであるBLASTを用いてデフォルトパラメータを用いて算出される。

#### 【0083】

本明細書において遺伝子、ポリヌクレオチド、ポリペプチドなどの「発現」とは、その遺伝子などがインビボで一定の作用を受けて、別の形態になることをいう。好ましくは、遺伝子、ポリヌクレオチドなどが、転写および翻訳されて、ポリペプチドの形態になることをいうが、転写されてmRNAが作製されることもまた発現の一態様であり得る。より好ましくは、そのようなポリペプチドの形態は、翻訳後プロセッシングを受けたものであり得る。

#### 【0084】

本明細書において「ヌクレオチド」は、天然のものでも非天然のものでもよい。「誘導体ヌクレオチド」または「ヌクレオチドアナログ」とは、天然に存在するヌクレオチドとは異なるがもとのヌクレオチドと同様の機能を有するものをいう。そのような誘導体ヌクレオチドおよびヌクレオチドアナログは、当該分野において周知である。そのような誘導体ヌクレオチドおよびヌクレオチドアナログの例としては、ホスホロチオエート、ホスホルアミデート、メチルホスホネート、キラルメチルホスホネート、2-Ο-メチルリボヌクレオチド、ペプチド-核

酸 (PNA) が含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0085】

本明細書において、「フラグメント」とは、全長のポリペプチドまたはポリヌクレオチド (長さが  $n$ ) に対して、 $1 \sim n-1$  までの配列長さを有するポリペプチドまたはポリヌクレオチドをいう。フラグメントの長さは、その目的に応じて、適宜変更することができ、例えば、その長さの下限としては、ポリペプチドの場合、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50 およびそれ以上のアミノ酸が挙げられ、ここの具体的に列挙していない整数で表される長さ (例えば、11 など) もまた、下限として適切であり得る。また、ポリヌクレオチドの場合、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、75、100 およびそれ以上のヌクレオチドが挙げられ、ここの具体的に列挙していない整数で表される長さ (例えば、11 など) もまた、下限として適切であり得る。

#### 【0086】

本発明において利用され得る一般的な分子生物学的手法としては、Ausubel F. A. ら編 (1988)、Current Protocols in Molecular Biology、Wiley、New York、NY; Sambrook J ら (1987) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NYなどを参酌して当業者であれば容易に実施をすることができる。

#### 【0087】

本明細書において遺伝子について言及する場合、「ベクター」とは、目的のポリヌクレオチド配列を目的の細胞へと移入させることができるものをいう。そのようなベクターとしては、原核生物細胞、酵母、動物細胞、植物細胞、昆虫細胞、動物個体および植物個体等の宿主細胞、好ましくは植物細胞において自律複製が可能であるか、または染色体中への組込みが可能で、本発明のポリヌクレオチドの転写に適した位置にプロモーターを含有しているものが例示される。

## 【0088】

「発現ベクター」は、構造遺伝子およびその発現を調節するプロモーターに加えて種々の調節エレメントが宿主の細胞中で作動し得る状態で連結されている核酸配列をいう。調節エレメントは、好ましくは、ターミネーター、薬剤耐性遺伝子のような選択マーカーおよび、エンハンサーを含み得る。生物（例えば、植物）の発現ベクターのタイプおよび使用される調節エレメントの種類が、宿主細胞に応じて変わり得ることは、当業者に周知の事項である。選抜のための選択マーカーとしては、抗生物質カナマイシンに対する耐性を与える酵素ネオマイシンホスホトランスフェラーゼをコードする *neo* 遺伝子 (Beckら (1982) *Gene* 19:327) ; 抗生物質ハイグロマイシンに対する耐性を与える酵素ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼをコードする *hyg* 遺伝子 (Gritz及びDavies (1983) *Gene* 25:179) ; 及び除草剤ホスフィノトリシン (*phosphinothricin*) に対する耐性を与えるホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼをコードする *bar* 遺伝子 (EP 242236) ; ストレプトマイシンフォスフォトランスフェラーゼをコードする *spt* 遺伝子 ; ストレプトマイシン耐性遺伝 ; スペクチノマイシン耐性遺伝子などの薬剤耐性遺伝子（例えば、H. S. Chawla、2002、*Introduction to Plant Biotechnology* 2nd、p. 363、Science Publishers, Inc. 単行本） ; ならびに  $\beta$ -グルクロニダーゼをコードする *gus* 遺伝子 (Jeffersonら (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 6:3901) 及びルシフェラーゼ遺伝子 (Owら (1986) *Science* 234:856) のようなスクリーン可能なマーカー遺伝子が挙げられるが、これらに限定されない。

## 【0089】

本発明において選抜に使用する薬剤としては、カナマイシン、ハイグロマイシン、ジェネティシン、ゲンタマイシン、ストレプトマイシン、スペクチノマイシンが挙げられるがこれらに限定されない。

## 【0090】

「組換えベクター」とは、目的のポリヌクレオチド配列を目的の細胞へと移入させることができるベクターをいう。そのようなベクターとしては、植物細胞、および植物個体等の宿主細胞において自立複製が可能、または染色体中への組込みが可能で、本発明のポリヌクレオチドの転写に適した位置にプロモーターを含有しているものが例示される。

#### 【0091】

植物細胞に対する「組換えベクター」としては、Tiプラスミド、タバコモザイクウイルスベクター、ジェミニウイルスベクターなどが例示される。

#### 【0092】

「ターミネーター」は、遺伝子のタンパク質をコードする領域の下流に位置し、DNAがmRNAに転写される際の転写の終結、ポリA配列の付加に参与する配列である。ターミネーターは、mRNAの安定性に参与して遺伝子の発現量に影響を及ぼすことが知られている。ターミネーターとしては、CaMV35Sターミネーター、ノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター (Tnos)、タバコPR1a遺伝子のターミネーターが挙げられるが、これに限定されない。本明細書において用いられる「プロモーター」とは、遺伝子の転写の開始部位を決定し、またその頻度を直接的に調節するDNA上の領域をいい、RNAポリメラーゼが結合して転写を始める塩基配列である。プロモーターの領域は、通常、推定タンパク質コード領域の第1エキソンの上流約2kbp以内の領域であることが多いので、DNA解析用ソフトウェアを用いてゲノム塩基配列中のタンパク質コード領域を予測すれば、プロモーター領域を推定することはできる。推定プロモーター領域は、通常構造遺伝子上流にあるが、好ましくは、推定プロモーター領域は、第一エキソン翻訳開始点から上流約2kbp以内に存在する。

#### 【0093】

本明細書において、遺伝子の発現について用いられる場合、一般に、「部位特異性」とは、生物（例えば、植物）の部位（例えば、植物の場合、根、茎、幹、葉、花、種子、胚芽、胚、果実など）におけるその遺伝子の発現の特異性をいう。「時期特異性」とは、生物（たとえば、植物）の発達段階（例えば、植物であれば生長段階（例えば、発芽後の芽生えの日数）に応じたその遺伝子の発現の特



異性をいう。そのような特異性は、適切なプロモーターを選択することによって、所望の生物に導入することができる。

#### 【0094】

本明細書において、本発明のプロモーターの発現が「構成的」であるとは、生物のすべての組織において、その生物の生長の幼若期または成熟期のいずれにあってもほぼ一定の量で発現される性質をいう。具体的には、本明細書の実施例と同様の条件でノーザンブロット分析したとき、例えば、任意の時点で（例えば、2点以上（例えば、5日目および15日目））の同一または対応する部位のいずれにおいても、ほぼ同程度の発現量がみられるとき、本発明の定義上、発現が構成的であるという。構成的プロモーターは、通常の生育環境にある生物の恒常性維持に役割を果たしていると考えられる。本発明のプロモーターの発現が「ストレス応答性」であるとは、少なくとも1つのストレスが生物体を与えられたとき、その発現量が増加する性質を「ストレス誘導性」といい、発現量が減少する性質を「ストレス抑制性」という。「ストレス抑制性」の発現は、正常時において、発現が見られることを前提としているので、「構成的」な発現と重複する概念である。これらの性質は、生物の任意の部分からRNAを抽出してノーザンブロット分析で発現量を分析することまたは発現されたタンパク質をウェスタンブロットにより定量することにより決定することができる。ストレス誘導性のプロモーターを本発明のポリペプチドをコードする核酸とともに組み込んだベクターで形質転換された植物または植物の部分（特定の細胞、組織など）は、そのプロモーターの誘導活性をもつ刺激因子を用いることにより、ある条件下での特定の遺伝子の発現を行うことができる。

#### 【0095】

「エンハンサー」は、目的遺伝子の発現効率を高めるために用いられ得る。植物において使用する場合、エンハンサーとしては、CaMV 35Sプロモーター内の上流側の配列を含むエンハンサー領域が好ましい。エンハンサーは複数個用いられ得るが1個用いられてもよいし、用いなくともよい。

#### 【0096】

本明細書において「作動可能に連結された（る）」とは、所望の配列の発現（

作動)がある転写翻訳調節配列(例えば、プロモーター、エンハンサーなど)または翻訳調節配列の制御下に配置されることをいう。プロモーターが遺伝子に作動可能に連結されるためには、通常、その遺伝子のすぐ上流にプロモーターが配置されるが、プロモーターと構造遺伝子との間に介在する配列が存在してもよい。ため、プロモーターと構造遺伝子とは必ずしも隣接して配置される必要はない。

#### 【0097】

導入した遺伝子の存在は、サザンブロット法によって確認し得る。導入した遺伝子の発現は、ノーザンブロット法またはPCR法により、検出し得る。必要に応じて、遺伝子産物たるタンパク質の発現を、例えば、ウェスタンブロット法により確認し得る。

#### 【0098】

以下に、実施例に基づいて本発明を説明するが、以下の実施例は、例示の目的のみに提供される。従って、本発明の範囲は、上記発明の詳細な説明にも下記実施例にも限定されるものではなく、請求の範囲によってのみ限定される。

#### 【0099】

##### 【実施例】

(方法および材料)

##### (1) 導入遺伝子

本発明においては、抗生物質耐性遺伝子および/あるいはGUS遺伝子を含むプラスミドDNAを主に用いたが、これらに限定されない。実施例においては以下の3種のプラスミドを用いた。pBI221はClontech社のもので、カリフラワーモザイクウイルス(CMV)の35Sプロモーター、 $\beta$ グルクロニダーゼ(GUS)遺伝子、ノパリン合成酵素(NOS)遺伝子のターミネーターを含んでいる。主に導入遺伝子の発現をGUS活性でモニターする目的で用いた。pWI-H5K(図1にその制限酵素マップを記載する)は、pWI-GUS(Masashi Ugaki et al. 1991 Replication of a geminivirus derived shuttle vector in maize endosperm cells. Nucleic Acids Research 19(2):371-377)のGU

S 遺伝子を除去して、n p t I I 遺伝子を挿入することにより構築した。この p W I - H 5 K は、h p t (ハイグロマイシン耐性遺伝子) と CMV のターミネーター並びに n p t I I (カナマイシン及びゲンタマイシン耐性遺伝子)、CMV の 3 5 S プロモーターとターミネーターを含んでいる。p B C - 1 は、モンサント社のフロム博士が開発したものであるが、トウモロコシのアルコール脱水素酵素遺伝子のプロモーターとイントロンの一部、G U S 遺伝子、N O S のターミネーター並びに CMV の 3 5 S プロモーター、h p t (ハイグロマイシン耐性遺伝子)、N O S のターミネーターを含んでいる (H a g i o ら、P l a n t C e l l R e p . 1 4 : 3 2 9 - 3 3 4 , 1 9 9 5 ) 。

#### (2) 種子の前処理 (1 日目)

種子は当研究所で生育したもの、あるいは種苗会社から購入したものを用いた。目視により適当な完熟種子を約 1 0 ~ 3 0 粒選択し (種子の大きさにより異なる)、水道水中にて 2 5 ℃で一晩吸水させた。

#### (3) エレクトロポレーションの装置

本発明に用いたエレクトロポレーションの装置には、市販のエレクトロポレーション装置 (例えば、C U Y 2 1 E D I T 遺伝子導入装置、ネッパジーン社、千葉県市川市) を使用し得る。

#### 【0100】

本実施例においてエレクトロポレーションを行う際に使用されるエレクトロポレーションチャンバーは、形質転換の対象となる植物組織を収容できるものであれば、どのような大きさであってもよいが、冷却可能なチャンバーが好ましい。本実施例では、白金電極を備える縦 1 c m × 横 2 c m × 高さ 2 c m のエレクトロポレーションチャンバーを使用した。

#### (4) 緩衝液の調製 (2 日目)

1 回の実験に、1 . 5 m l の以下の緩衝液と 1 5 0 マイクログラムのプラスミド DNA を用いた。緩衝液の組成は、2 5 0 m M 塩化カルシウム、1 2 . 5 m M スペルミジン、0 . 5 % ポリビニルピロリドン、0 . 3 % T w e e n 2 0 である。

。

#### (5) 減圧処理

直径 35×深さ 10 mm シャーレに緩衝液と発芽を始めた種子を入れ、0.096 MPa の減圧処理を 1 時間行った。

#### (6) エレクトロポレーション

減圧処理の後、シャーレの中の種子と緩衝液をチャンバーに移し、氷上に 1 分間静置した。そして、実施例に示すように、100 V あるいは 50 V の電圧で（ただし、電極間の距離は 1 cm）、パルス幅 50 マイクロ秒の矩形波（50 マイクロ秒の間、電圧を加え、75 マイクロ秒休む周期を繰り返す）、パルス回数 50 回あるいは 99 回行った。さらに氷上にチャンバーを 2 分間静置した後、元のシャーレに処理した種子と緩衝液を共に戻した。シャーレを 4℃ で約 1 時間保存した後、25℃ で一晩静置した。

#### (7) 種子の後処理（3 日目）

翌日、緩衝液を捨て、水道水を 2 ml 加えて 25℃ で一晩静置した。

#### (8) GUS 分析（4 日目）

翌々日、水を捨て、X-Gluc 液（100 mM pH 7.0 リン酸緩衝液、0.05% X-Gluc（5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -D-グルクロニド シクロヘキシルアンモニウム塩）、0.5 mM フェリシアン化カリウム、0.5 mM フェロシアン化カリウム、0.3% トリトン X-100、20% メタノール）を 2 ml 加え、25℃ で一晩静置した。5 日目以降の染色の程度から GUS 遺伝子の発現を確認した。

#### (9) 抗生物質培地による選抜（4 日目以降）

GUS 分析を行わず、以下のように生育させた。

- a) 7 cm のろ紙を敷いた 9 cm×15 mm のシャーレに、種子を移した。
- b) 蒸留水に溶かした抗生物質を 10 ml 添加した。コムギの種子をジェネティシンで選抜するときは濃度 2000 ppm であった。なお、イネの種子をジェネティシンで選抜するときの濃度は、200 ppm であった。
- c) 培養室で、25℃ 明期 16 時間（約 2000 ルクス） 暗期 8 時間にて、育成した。

#### (10) 形質転換体の育成（11 日目以降）

抗生物質培地による選抜の後、植物を、園芸用培土（ニューマジックソイル；

株式会社サカタのタネ、横浜市都筑区)を入れた直径8.5cm、高さ5.5cmの尾ポット(植木鉢)を用いて、隔離型のグロスチャンバーで育成した(15℃ 明期8時間(ナトリウムランプ、約50000ルクス)、暗期16時間)。

#### (11) DNAの抽出

遺伝子導入を確認するPCRを行うために、形質転換植物の葉および茎を採取して、DNAを抽出した。DNAの抽出には、任意の周知の方法を使用し得る。代表的なDNA抽出方法は、CTAB法である(内宮博文「植物遺伝子操作マニュアル トランスジェニック植物の作り方」講談社サイエンティフィック、71-74頁(1989 単行本))。

#### (12) PCR分析

エレクトロポレーション後、14日目の個体の葉からDNAを抽出し、NPTII遺伝子を検出する一対のプライマー(5'-ctgctgcaattccattcttg-3':配列番号1、5'-actctgtcaagaaggcgattagaag-3':配列番号2)を用いてPCRを行った。ポリメラーゼは、株式会社パーキンエルマージャパン(横浜市西区)のAmpliTaq Goldを、製造業者の指示に従って、使用した。増幅に使用したサーマルサイクラーの条件は:

- (a) 95℃ 10分間を1サイクル;
- (b) 95℃ 1分間、64℃ 2分間、72℃ 2分間を50サイクル;
- (c) 72℃ 7分間を1サイクル;および
- (d) その後4℃にて保存であった。

#### (13) 遺伝解析

PCR分析により導入遺伝子を確認された植物について、さらに生育させ、自家受粉により多数の完熟種子を得た。その中からランダムに約100個の種子を取り、籾殻を除いた後、ジェネティシンまたはハイグロマイシンを含む培地の上に種子を置床した。ジェネティシンまたはハイグロマイシン耐性の種子と感受性の種子(抗生物質を含む培地上で死滅したもの)の数をそれぞれ調査した。

【0101】

## (実施例1)

## (コムギの形質転換)

コムギ農林61号の完熟種子を供試した。25℃で一晩吸水させ、発芽を始めた種子30粒及びpWI-GUS (GUS分析用) あるいはpWI-H5K (生育用) のDNA (100  $\mu$ g/2ml) を添加したエレクトロポレーション緩衝液2mlをシャーレに入れた。0.096MPaで1時間減圧処理を行った後、シャーレの中の種子と緩衝液をチャンバーに移し、氷上に1分間静置後、電気パルスを加した。その電氣的条件は以下に記載するとおりである。パルス幅は50マイクロ秒、パルス回数は50回であった。さらに氷上にチャンバーを2分間静置後、元のシャーレに種子と緩衝液を共に戻した。シャーレを4℃約1時間保存した後、25℃で1晩静置した。翌日、緩衝液を捨て、蒸留水を2ml加えて25℃で1晩静置した。さらに翌々日、蒸留水を捨て、X-Glu c液を2ml加えて25℃で1晩静置した。GUS活性を指標にした遺伝子発現量の結果を以下の表1に示す:

(表1)

電圧 (V/cm)	遺伝子発現量	備考
0	—	
10	—	
20	—	
50	±	
75	±	
100	+	
150	—	種子は褐変・枯死
200	—	種子は褐変・枯死。

## 【0102】

上記の結果から、100V (ただし、電極間の距離は1cm) の電圧条件において、最も効率よく形質転換が可能であることが示される。

## 【0103】

同様の結果を、図2に示す。図2は、パルス幅50マイクロ秒、パルス回数50回、減圧条件0.096MPaの条件下で、A:100V、B:50V、C:20V、D:0Vという電圧条件にてエレクトロポレーションを行った結果を示す。100Vの条件での形質転換効率が最も高かった。

#### 【0104】

図3は、1:電圧100V、パルス幅50マイクロ秒、パルス回数50回、減圧条件0.096MPaの条件下で、形質転換したコムギ種子、2:減圧処理を行わずに、電圧100V、パルス幅50マイクロ秒、パルス回数50回のエレクトロポレーションのみを行ったコムギ種子、3:コントロールのコムギ種子の写真である。図3に示すように、減圧処理とエレクトロポレーションを組み合わせただけの場合にのみ、形質転換を行うことができた。

#### 【0105】

生育用の種子はGUS活性の実験を行わず、減圧処理の後、ジェネティシン2000ppmを含む蒸留水の上で生育させた(上記(7)種子の後処理、(9)抗生物質培地による選抜、および(10)形質転換体の育成のとおりに行った)。その結果を図4に示す。生育した幼苗からDNAを抽出しPCR法で導入遺伝子の存在確認を行った(上記(11)DNAの抽出、および(12)PCR分析のとおりに行った)。

#### 【0106】

配列番号1および2を用いたPCRの結果、NPTII遺伝子が植物体に導入されていることが確認された。

#### 【0107】

(実施例2)

イネジャポニカ品種コシヒカリの完熟種子を材料に用いた。

#### 【0108】

25℃で1晩吸水させ、発芽を始めた種子30粒及びpWI-GUSあるいはPWI-H5KのプラスミドDNA(100μg/2ml)を添加したエレクトロポレーション緩衝液2mlをシャーレに入れた。0.096MPaで1時間減圧処理を行った後、シャーレの中の種子と緩衝液をチャンバーに入れ、氷上に

1 分間静置後、エレクトロポレーションにより電気パルスを印加した。その電氣的条件は電圧 50 V（ただし、電極間の距離は 1 cm）、パルス幅 50 マイクロ秒、パルス回数 99 回であった。さらに氷上にチャンバーを 2 分間静置後、元のシャーレに種子と緩衝液を共に戻した。シャーレを 4℃ 約 1 時間保存した後、25℃ で 1 晩静置した。翌日、緩衝液を捨て、蒸留水を 2 ml 加えて 25℃ で 1 晩静置した。さらに翌々日、蒸留水を捨て、X-Gluc 液を 2 ml 加えて 25℃ で 1 晩静置した。GUS 活性を指標にした遺伝子発現量の結果を以下の表 2 に示す：

(表 2)

電圧 (V / cm)	遺伝子発現量	備考
0	—	
10	—	
20	±	
50	+	
75	±	種子は褐変・生育不良
100	—	種子は褐変・枯死
150	—	種子は褐変・枯死
200	—	種子は褐変・枯死。

## 【0109】

上記の結果から、50 V（ただし、電極間の距離は 1 cm）の電圧条件において、最も効率よく形質転換が可能であることが示される。

## 【0110】

同様の結果を、図 5 に示す。図 5 は、パルス幅 50 マイクロ秒、パルス回数 99 回、減圧条件 0.096 MPa の条件下で、A：50 V、B：20 V、C：10 V、D：0 V という電圧条件にてエレクトロポレーションを行った結果を示す。50 V の条件での形質転換効率が最も高かった。

## 【0111】

図 6 は、1：電圧 50 V、パルス幅 50 マイクロ秒、パルス回数 99 回、減圧



条件 0.096 MPa の条件下で、形質転換したイネ種子、2:減圧処理を行わずに、電圧 50 V、パルス幅 50 マイクロ秒、パルス回数 99 回のエレクトロポレーションのみを行ったイネ種子、3:コントロールのイネ種子の写真である。図 6 に示すように、減圧処理とエレクトロポレーションを組み合わせた場合にのみ、形質転換を行うことができた。

#### 【0112】

生育用の種子は GUS 活性の実験を行わず、減圧処理の後、ジェネティシン 200 ppm を含む蒸留水の上で生育させた（上記（7）種子の後処理、（9）抗生物質培地による選抜、および（10）形質転換体の育成のとおりに行った）。その結果を図 7 に示す。

#### 【0113】

（実施例 3）

イネインディカ品種（IR24）の完熟種子を材料に用いた。

#### 【0114】

25℃で1晩吸水させ、発芽を始めた種子30粒および pBI221 または PWH5K のプラスミド DNA (100 μg/2 ml) を添加したエレクトロポレーション緩衝液 2 ml をシャーレに入れた。0.096 MPa で1時間減圧処理を行った後、シャーレの中の種子と緩衝液をチャンバーに入れ、氷上に1分間静置後、エレクトロポレーションにより電気パルスを印加した。その電気的條件は電圧 50 V（ただし、電極間の距離は 1 cm）、パルス幅 50 マイクロ秒、パルス回数 99 回であった。さらに氷上にチャンバーを2分間静置後、元のシャーレに種子と緩衝液を共に戻した。シャーレを 4℃約1時間保存した後、25℃で1晩静置した。翌日、緩衝液を捨て、蒸留水を 2 ml 加えて 25℃で1晩静置した。さらに翌々日、蒸留水を捨て、X-Gluc 液を 2 ml 加えて 25℃で1晩静置した。その結果を図 8 に示す。図 8 に示すように、減圧処理とエレクトロポレーションを組み合わせた場合にのみ、形質転換を行うことができた。

#### 【0115】

また、減圧処理の後、ジェネティシン 200 ppm を含む蒸留水の上で選抜する。

## 【0116】

## (実施例4)

ダイズ品種オオスズの完熟種子を材料に用いた。25℃で1晩吸水させ、発芽を始めた。

## 【0117】

種子10粒及びpBC1あるいはpWI-GUSのプラスミドDNA (100  $\mu$ g/2ml) を添加したエレクトロポレーション緩衝液2mlをシャーレに入れた。0.096MPaで1時間減圧処理を行った後、シャーレの中の種子と緩衝液をチャンバーに入れ、氷上に1分間静置後、エレクトロポレーションにより電気パルスを印加した。その電氣的条件は電圧100V (ただし、電極間の距離は1cm)、パルス幅50マイクロ秒、パルス回数50回であった。さらに氷上にチャンバーを2分間静置後、元のシャーレに種子と緩衝液を共に戻した。シャーレを4℃約1時間保存した後、25℃で1晩静置した。翌日、緩衝液を捨て、蒸留水を2ml加えて25℃で1晩静置した。さらに翌々日、蒸留水を捨て、X-Glu c液を2ml加えて25℃で1晩静置した。形質転換が成功した結果を図9に示す。

## 【0118】

## (実施例5)

トウモロコシ (品種: ピーターコーン) の完熟種子を材料に用いた。25℃で1晩吸水させ、発芽を始めた種子3粒及びプラスミドDNA (100  $\mu$ g/2ml) を添加したエレクトロポレーション緩衝液2mlをシャーレに入れた。0.0098MPaで1時間減圧処理を行った後、

シャーレの中の種子と緩衝液をチャンバーに入れ、氷上に1分間静置後、エレクトロポレーションにより電気パルスを印加した。その電氣的条件は電圧100V (ただし、電極間の距離は1cm)、パルス幅50マイクロ秒、パルス回数50回である。さらに氷上にチャンバーを2分間静置後、元のシャーレに種子と緩衝液を共に戻す。シャーレを4℃約1時間保存した後、25℃で1晩静置した。翌日、緩衝液を捨て、蒸留水を2ml加えて25℃で1晩静置する。さらに翌々日、蒸留水を捨て、X-Glu c液を2ml加えて25℃で1晩静置する。

## 【0119】

## (実施例6)

ハクサイ (品種; 無双) の完熟種子を材料に用いた。25℃で1晩吸水させ、発芽を始めた種子30粒及びプラスミドDNA (100  $\mu$ g / 2 ml) を添加したエレクトロポレーション緩衝液2 ml をシャーレに入れた。0.096 MPa で1時間減圧処理を行った後、シャーレの中の種子と緩衝液をチャンバーに入れ、氷上に1分間静置後、エレクトロポレーションにより電気パルスを加した。その電気的条件は電圧100 V (ただし、電極間の距離は1 cm)、パルス幅50マイクロ秒、パルス回数50回であった。さらに氷上にチャンバーを2分間静置後、元のシャーレに種子と緩衝液を共に戻した。シャーレを4℃約1時間保存した後、25℃で1晩静置した。翌日、緩衝液を捨て、蒸留水を2 ml 加えて25℃で1晩静置した。さらに翌々日、蒸留水を捨て、X-Gluc 液を2 ml 加えて25℃で1晩静置した。形質転換が成功した結果を図10に示す。

## 【0120】

## (実施例7)

トマト (品種ミニキャロル) の完熟種子を材料に用いた。25℃で1晩吸水させ、発芽を始めた種子30粒及びプラスミドDNA (100  $\mu$ g / 2 ml) を添加したエレクトロポレーション緩衝液2 ml をシャーレに入れた。0.096 MPa で1時間減圧処理を行った後、シャーレの中の種子と緩衝液をチャンバーに入れ、氷上に1分間静置後、エレクトロポレーションにより電気パルスを加した。その電気的条件は電圧100 V (ただし、電極間の距離は1 cm)、パルス幅50マイクロ秒、パルス回数50回であった。さらに氷上にチャンバーを2分間静置後、元のシャーレに種子と緩衝液を共に戻した。シャーレを4℃約1時間保存した後、25℃で1晩静置した。翌日、緩衝液を捨て、蒸留水を2 ml 加えて25℃で1晩静置した。さらに翌々日、蒸留水を捨て、X-Gluc 液を2 ml 加えて25℃で1晩静置した。形質転換が成功した結果を図11に示す。

## 【0121】

## (実施例8)

マクワウリ (品種: キンショメロン) の完熟種子を材料に用いる。25℃で

1晩吸水させ、発芽を始める。

【0122】

種子40粒及びプラスミドDNA ( $100\mu\text{g}/2\text{ml}$ ) を添加したエレクトロポレーション緩衝液2mlをシャーレに入れる。0.096MPaで1時間減圧処理を行った後、シャーレの中の種子と緩衝液をチャンバーに入れ、氷上に1分間静置後、エレクトロポレーションにより電気パルスを印加する。その電氣的条件は電圧100V (ただし、電極間の距離は1cm)、パルス幅50マイクロ秒、パルス回数50回である。

【0123】

さらに氷上にチャンバーを2分間静置後、元のシャーレに種子と緩衝液を共に戻す。

【0124】

シャーレを4℃約1時間保存した後、25℃で1晩静置した。翌日、緩衝液を捨て、蒸留水を2ml加えて25℃で1晩静置する。さらに翌々日、蒸留水を捨て、X-Glu c液を2ml加えて25℃で1晩静置する。

【0125】

(実施例9)

アサガオ (品種「サンスマイル」と「曜白大輪」) の完熟種子を材料に用いた。25℃で1晩吸水させ、発芽を始めた種子10粒及びプラスミドDNA ( $100\mu\text{g}/2\text{ml}$ ) を添加したエレクトロポレーション緩衝液2mlをシャーレに入れた。0.096MPaで1時間減圧処理を行った後、シャーレの中の種子と緩衝液をチャンバーに入れ、氷上に1分間静置後、エレクトロポレーションにより電気パルスを印加した。その電氣的条件は電圧100V (ただし、電極間の距離は1cm)、パルス幅50マイクロ秒、パルス回数50回であった。さらに氷上にチャンバーを2分間静置後、元のシャーレに種子と緩衝液を共に戻した。シャーレを4℃約1時間保存した後、25℃で1晩静置した。翌日、緩衝液を捨て、蒸留水を2ml加えて25℃で1晩静置した。さらに翌々日、蒸留水を捨て、X-Glu c液を2ml加えて25℃で1晩静置した。形質転換が成功した結果を図12に示す。

## 【0126】

## (実施例10)

マウワウリ（品種「キンショーマロン」）の完熟種子を材料に用いた。25℃で1晩吸水させ、発芽を始めた種子30粒及びプラスミドDNA（100 $\mu$ g／2ml）を添加したエレクトロポレーション緩衝液2mlをシャーレに入れた。減圧なし、ならびに0.06MPaおよび0.096MPaで1時間減圧処理を行った後、シャーレの中の種子と緩衝液をチャンバーに入れ、氷上に1分間静置後、エレクトロポレーションにより電気パルスを印加した。その電気的条件は電圧100V（ただし、電極間の距離は1cm）、パルス幅50マイクロ秒、パルス回数50回であった。さらに氷上にチャンバーを2分間静置後、元のシャーレに種子と緩衝液を共に戻した。シャーレを4℃約1時間保存した後、25℃で1晩静置した。翌日、緩衝液を捨て、蒸留水を2ml加えて25℃で1晩静置した。さらに翌々日、蒸留水を捨て、X-Glu c液を2ml加えて25℃で1晩静置した。その結果は、以下の表3のとおりである：

(表3)

減圧 (MPa)	遺伝子発現量
----------	--------

0	-1
0.06	-1
0.096	+2

1-；形質転換した全ての種子において、X-Glu cによる染色が確認されなかった。

2+；形質転換した30個の種子中、15個以上の種子において、X-Glu cによる染色が確認された。

## 【0127】

この表では、X-Glu c液での染色の程度を、遺伝子発現量の指標とした。この結果に示されるとおり、マウワウリの場合は、0.096MPa程度の減圧条件が好ましい条件であった。

## 【0128】

次に、マクワウリの形質転換に好ましい電圧条件を検討した。0.096 MPa の減圧条件を用い、そして以下の表に示される電圧条件を用いた以外は、上記の条件で、マクワウリの形質転換を行った。その結果を以下の表 4 に示す：

(表 4)

電圧 (V / cm)	遺伝子発現量
0	-1
10	-1
20	-1
50	±2
75	±2
100	+3
150	±2
200	±2

1-；形質転換した全ての種子において、X-Gluc による染色が確認されなかった。

2±；形質転換した30個の種子中、1～14個の種子において、X-Gluc による弱い染色が確認された。

3+；形質転換した30個の種子中、15個以上の種子において、X-Gluc による染色が確認された。

## 【0129】

上記の結果から、100V（ただし、電極間の距離は1cm）の電圧条件において、最も効率よく形質転換が可能であることが示される。

## 【0130】

## 【発明の効果】

簡便かつ迅速な植物形質転換方法が提供される。

## 【0131】

簡便な本発明の方法はこの分野の開発研究において重要な大量処理・大量解析を容易にせしめ、ひいては飛躍的な研究の進歩を誘発し、画期的な組換え作物の

開発につながる。

【0132】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110>National Institute of Agrobiological Resources

<120>A method of transformation by pressurization or decompression, as well as electroporation

<130>J1-02412154

<140>none

<141>2002-07-15

<160>2

<170>PatentIn Ver. 2.1

<210>1

<211>19

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Description of Artificial Sequence:primer

<400>1

ctgcgtgcaatccatcttg

19

&lt;210&gt;2

&lt;211&gt;23

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;Description of Artificial Sequence:primer

&lt;400&gt;2

actcgtcaagaaggcgatag aag

23

**【図面の簡単な説明】****【図 1】**

図 1 は、pW I - H 5 K の制限酵素地図である。

**【図 2】**

図 2 は、コムギ（農林 6 1 号）を用いて、パルス幅 5 0 マイクロ秒、パルス回数 5 0 回、減圧条件 0. 0 9 6 MP a の条件下で、A : 1 0 0 V、B : 5 0 V、C : 2 0 V、D : 0 V という電圧条件にてエレクトロポレーションを行った結果を示す。

**【図 3】**

図 3 は、1 : 減圧処理 + エレクトロポレーションしたコムギ種子、2 : エレクトロポレーションのみを行ったコムギ種子、3 : コントロールのコムギ種子を G U S 染色した結果である。

**【図 4】**

図 4 は、形質転換したコムギのジェネティシン 2 0 0 0 p p m での選抜の結果を示す。A : プラスミドを用いたサンプル、B : プラスミドを用いないコントロール。



**【図 5】**

図 5 は、ジャポニカイネを用いて、パルス幅 50 マイクロ秒、パルス回数 99 回、減圧条件 0.096 MPa の条件下で、A: 50 V、B: 20 V、C: 10 V、D: 0 V という電圧条件にてエレクトロポレーションを行った結果を示す。

**【図 6】**

図 6 は、1: 減圧処理 + エレクトロポレーションしたジャポニカイネ種子、2: エレクトロポレーションのみを行ったジャポニカイネ種子、3: コントロールのジャポニカイネ種子を GUS 染色した結果である。

**【図 7】**

図 7 は、形質転換したジャポニカイネのジェネティシン 200 ppm での選抜の結果を示す。A: プラスミドを用いたサンプル、B: プラスミドを用いないコントロール。

**【図 8】**

図 8 は、A: 減圧処理 + エレクトロポレーションしたインディカイネ種子、B: エレクトロポレーションのみを行ったインディカイネ種子、C: コントロールのインディカイネ種子を GUS 染色した結果である。

**【図 9】**

図 9 は、1: 減圧処理 + エレクトロポレーションしたダイズ種子、2: コントロールのダイズ種子を GUS 染色した結果である。

**【図 10】**

図 10 は、A: 減圧処理 + エレクトロポレーションしたハクサイ種子、B: コントロールのハクサイ種子を GUS 染色した結果である。

**【図 11】**

図 11 は、A: 減圧処理 + エレクトロポレーションしたトマト種子、B: エレクトロポレーションのみを行ったトマト種子、C: コントロールのトマト種子を GUS 染色した結果である。

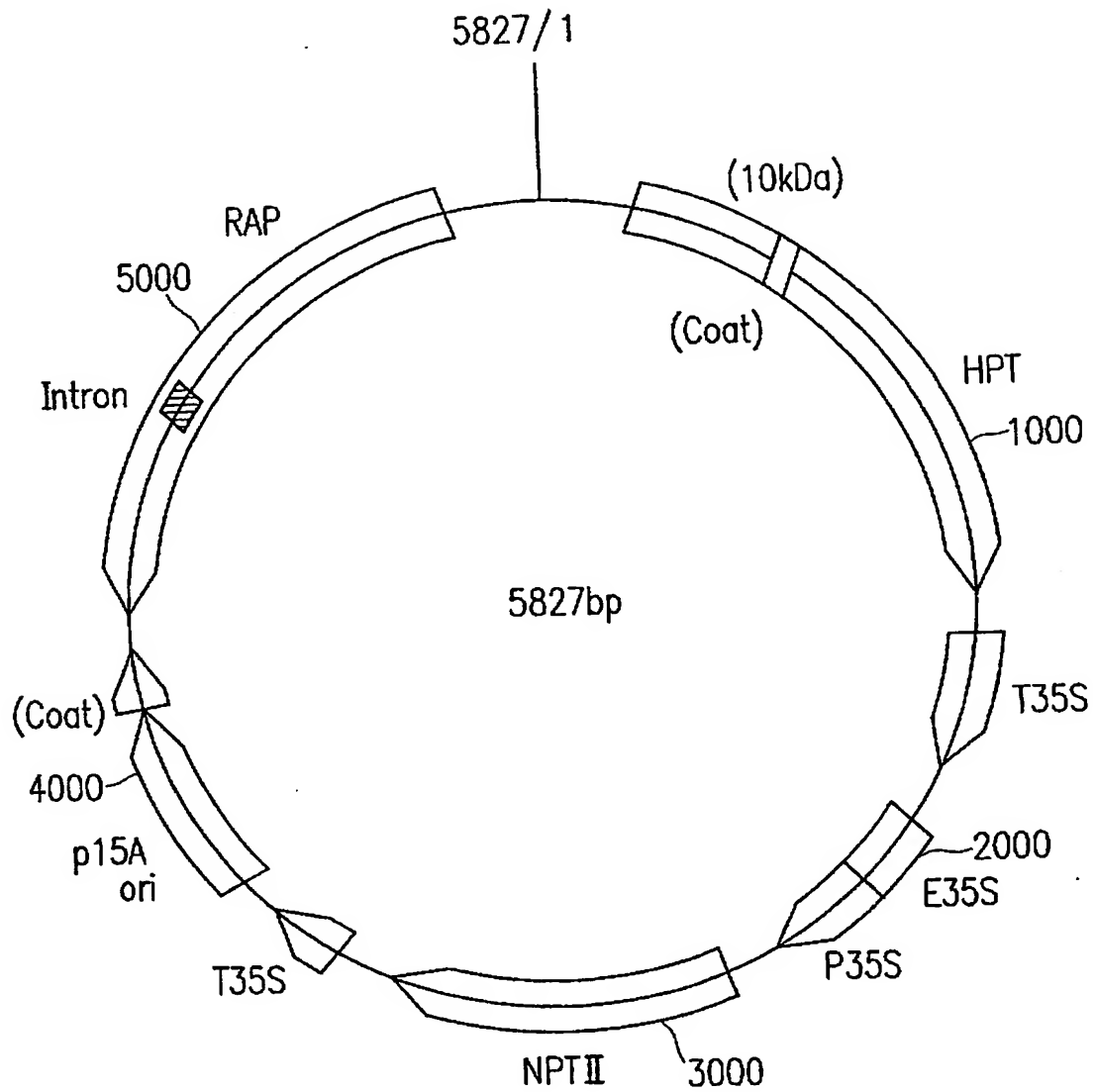
**【図 12】**

図 12 は、A: 減圧処理 + エレクトロポレーションしたアサガオ種子、B:

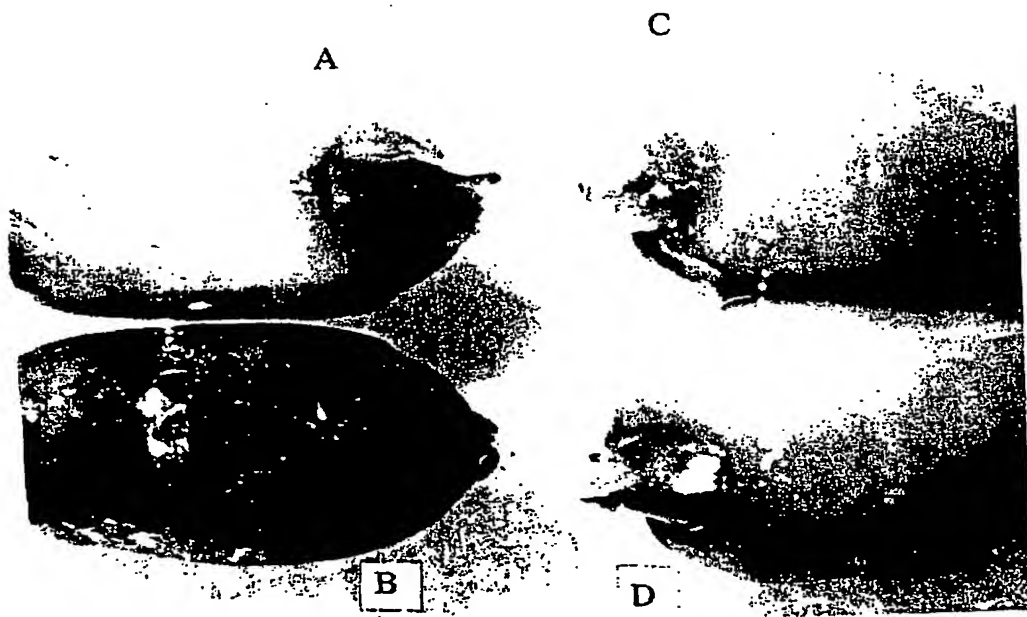
コントロールのアサガオ種子を G U S 染色した結果である。

【書類名】 図面

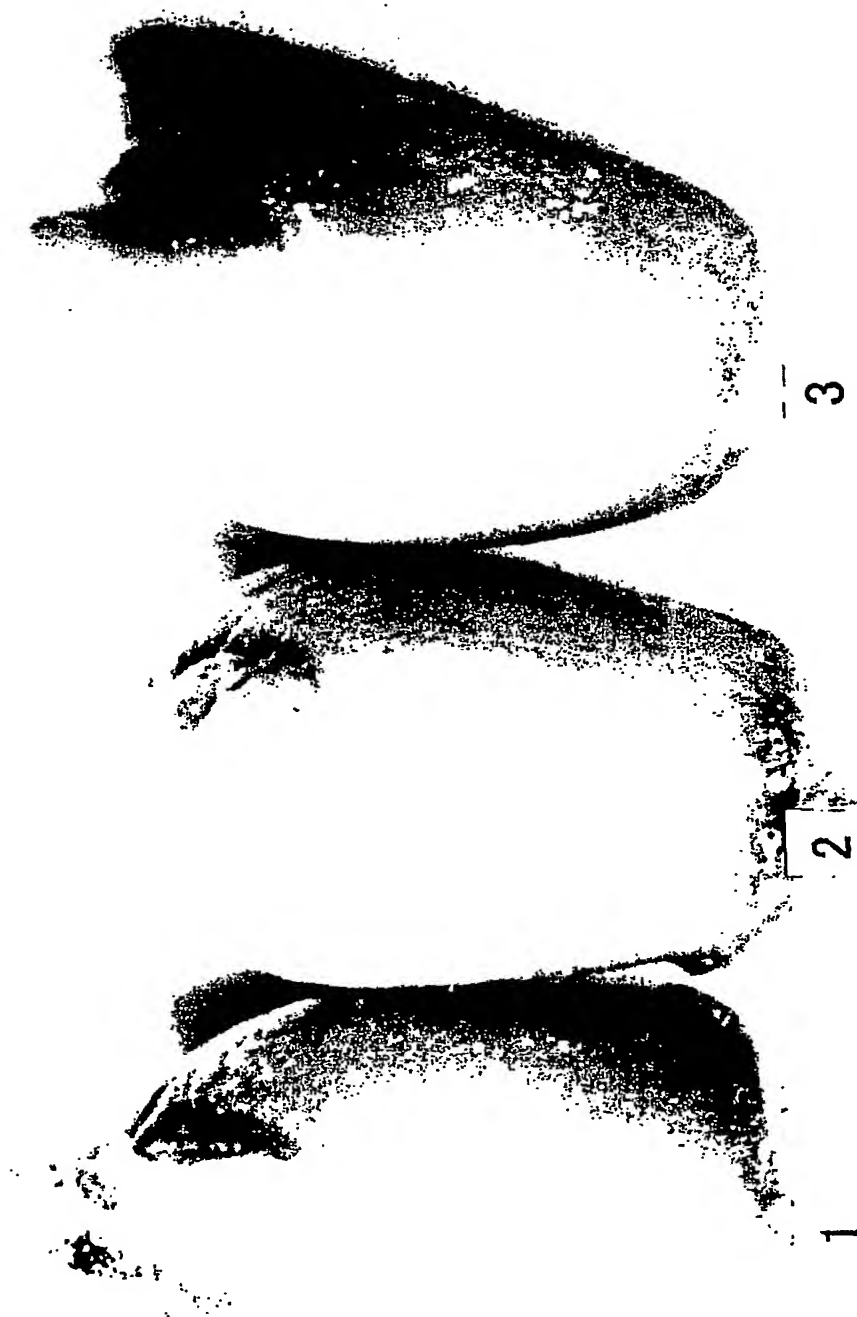
【図 1】



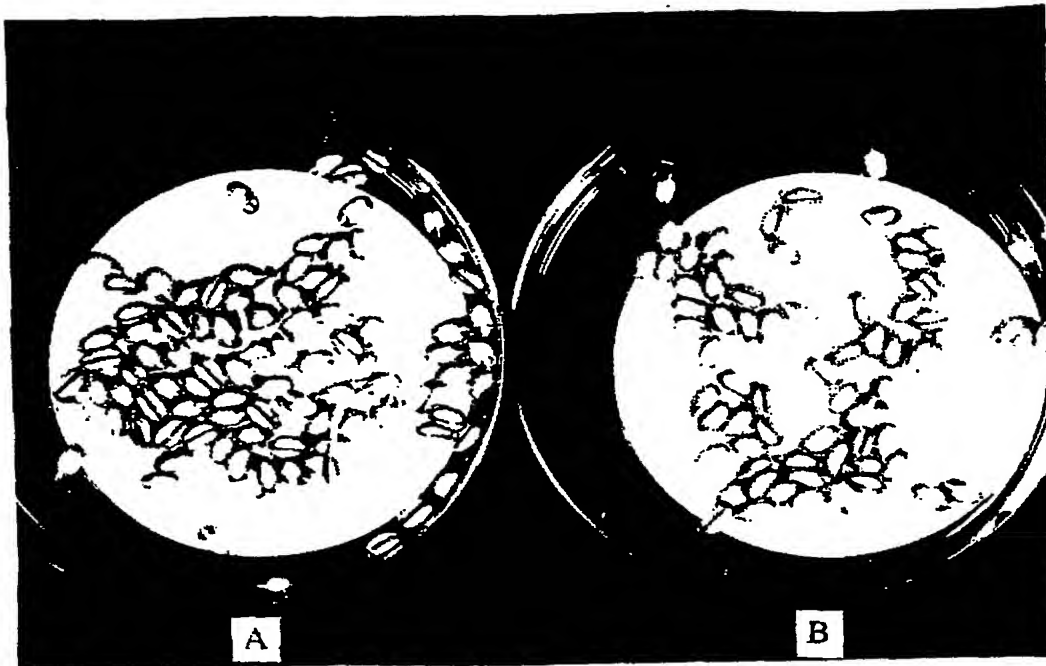
【図 2】



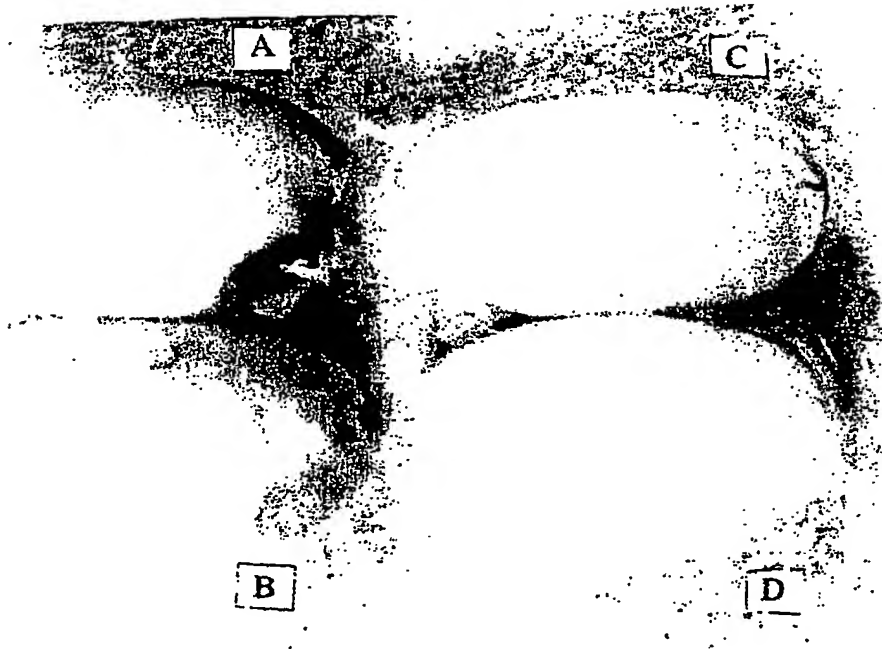
【図 3】



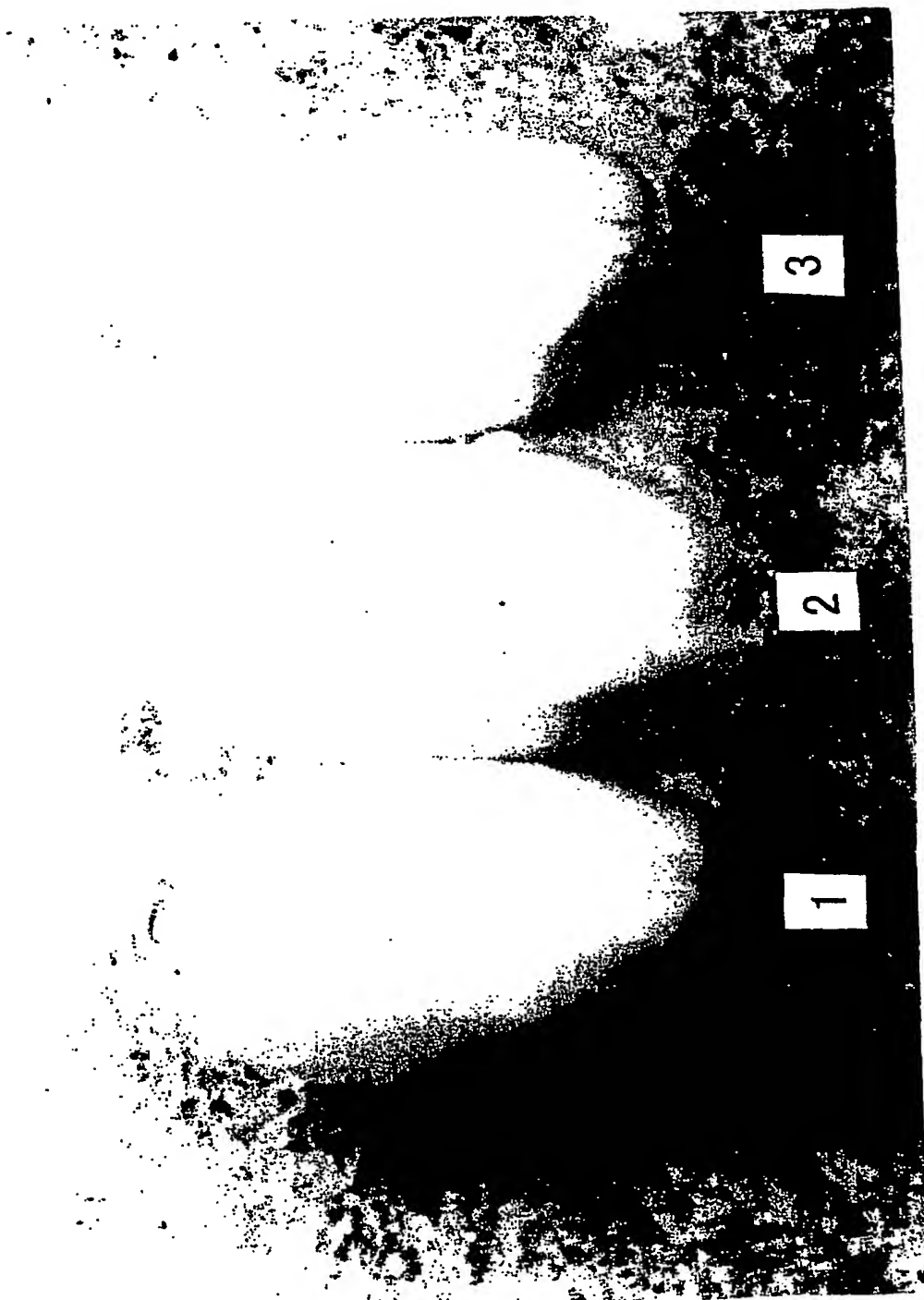
【図 4】



【図 5】

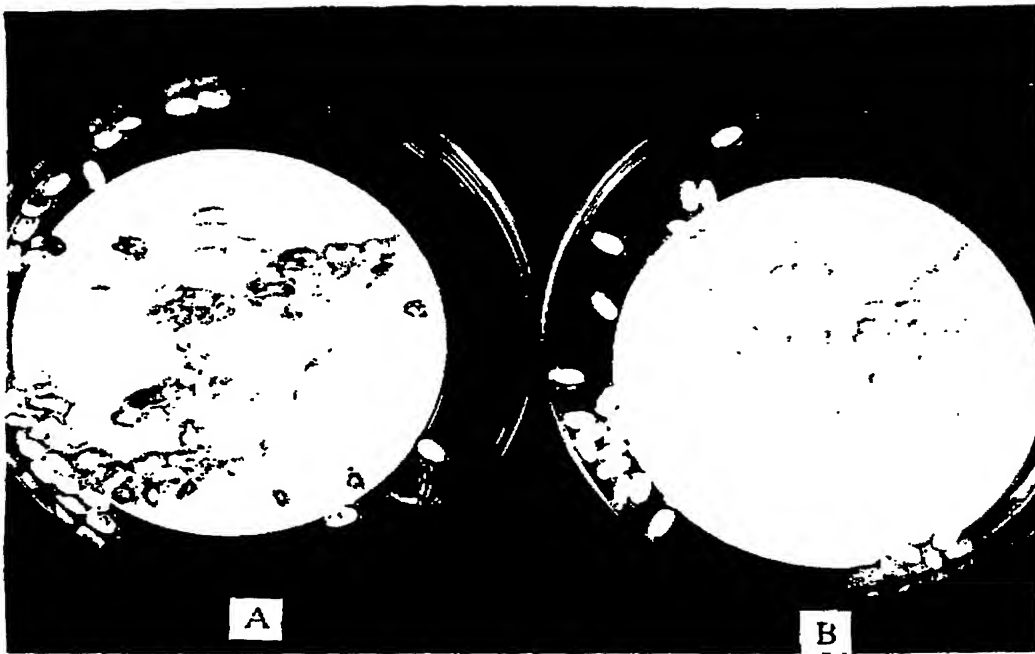


【図 6】





【図 7】



【図 8】



A

B

C

【図 9】



【図 10】



A



B

【図 11】



A



B



C

【図 12】



A



B

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 従来法と比較して簡便かつ迅速な植物形質転換方法を確立するために、植物に対して極めて簡便かつ迅速な植物の形質転換法を提供することを、本発明の課題とした。

【解決手段】 上記課題は、a) 植物組織を大気圧と異なる圧力下に維持する工程；およびb) エレクトロポレーションを用いて、所望の遺伝子を植物へ導入する工程を包含する方法によって解決される。

簡便な本発明の方法はこの分野の開発研究において重要な大量処理・大量解析を容易にせしめ、ひいては飛躍的な研究の進歩を誘発し、画期的な組換え作物の開発につながる。

【選択図】 なし

特願 2002-207611

出願人履歴情報

識別番号

[501167644]

1. 変更年月日

2001年 4月24日

[変更理由]

新規登録

住 所

茨城県つくば市観音台2丁目1-2

氏 名

独立行政法人農業生物資源研究所

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**